

冬虫夏草多糖的结构表征及改善胞葬功能障碍的作用与机制研究

杨兴茂^{1,2}, 杨采霞^{1,2},
周小全^{1,2}, 廖郑悦³, 刘思静^{3*}, 国锦琳^{1,2,3*}

¹成都中医药大学药学院 现代中药产业学院; ²西南特色中药资源国家重点实验室;

³成都中医药大学医学技术学院, 成都 610041

摘要: 基于过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 探究冬虫夏草多糖 (Cordyceps polysaccharides, CSP) 对改善巨噬细胞胞葬功能的作用及机制。采用水提醇沉法提取 CSP; 利用高效液相色谱法、PMP 柱前衍生高效液相色谱法、甲基化法分析 CSP 的分子量分布、单糖组成及糖苷键连接类型。通过 CCK-8 法、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和流式细胞术分别测定 CSP 对巨噬细胞细胞活力、胞葬相关基因及胞葬功能的影响; 采用间接免疫荧光法观察 CSP 对 PPAR- γ 的表达量和核定位的影响; 利用小干扰 RNA 转染技术验证 PPAR- γ 在 CSP 改善胞葬功能中的作用。结果显示, CSP 的总糖含量为 72.9%, 分子量分布为 21.9、2 100 kDa 及大于 50 000 kDa; 主要由葡萄糖、半乳糖和甘露糖三种单糖组成, 含 6 种主要糖苷键。与模型组相比, CSP 处理提高了胞葬相关基因 TAM 酪氨酸激酶受体 (Tyr03/Axl/Mer receptor tyrosine kinase, TAM) 和乳脂球表皮生长因子 8 (Milk fat globule-epidermal growth factor 8, Mfge8) 的表达 ($P < 0.05$) 以及巨噬细胞对凋亡细胞的胞葬能力 ($P < 0.05$)。免疫荧光结果表明 CSP 促进了 PPAR- γ 的蛋白表达 ($P < 0.001$) 与核转位。敲低 PPAR- γ 后, 逆转了 CSP 对巨噬细胞胞葬相关基因表达的促进作用。本研究表明 CSP 可能通过激活 PPAR- γ 信号通路增强氧化型低密度脂蛋白 (Oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的小鼠巨噬细胞胞葬作用。

关键词: 冬虫夏草; 多糖; 巨噬细胞; 胞葬

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)8-1288-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.8.002

Structural characterization of Cordyceps polysaccharides and their effects and mechanisms in improving efferocytosis

YANG Xing-mao^{1,2}, YANG Cai-xia^{1,2},
ZHOU Xiao-tong^{1,2}, LIAO Zhen-yue³, LIU Si-jing^{3*}, GUO Jin-lin^{1,2,3*}

¹School of Pharmacy/School of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine;

²State key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine;

³College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

Abstract: This study aims to explore the role and mechanism of Cordyceps polysaccharides (CSP) in improving macrophage efferocytosis function based on peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ). The CSP was extracted by hydro-alcohol precipitation. The molecular weight distribution, monosaccharide composition and methylation products of CSP were detected by high performance liquid gel chromatography, PMP-high performance liquid chromatography and methylation analysis, respectively. The effects of CSP on mouse macrophage cell viability, efferocytosis-related genes and efferocytosis rate were determined by CCK-8 assay, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and flow cytometry, respectively. The effect of CSP on PPAR- γ expression and nuclear localization was observed by immunofluorescence. Si-RNA was then used to knock down PPAR- γ to verify the possible target genes and signaling pathways of CSP. The results showed

收稿日期: 2024-02-18

接受日期: 2024-06-06

基金项目: 国家自然科学基金 (81872959, 81373920); 四川省科技厅项目 (2023NSFSC1757, 2023NSFSC3163)

* 通信作者 E-mail: liusijing@cdutcm.edu.cn, guo596@cdutcm.edu.cn

that the CSP contained 72.9% polysaccharides, with a molecular weight distribution of 21.9, 2 100 kDa and more than 50 000 kDa. The CSP was mainly composed of glucose, galactose and mannose, and it contains six main glycosidic bonds. Compared with the model group, CSP increased the expression of efferocytosis-related genes TAM receptor tyrosine kinase (Tyro3/Axl/Mer receptor tyrosine kinase, TAM), milk fat globule-epidermal growth factor 8 (Mfge8) and the efferocytosis rate of macrophages ($P < 0.05$). Meanwhile, CSP promoted the protein expression of PPAR- γ ($P < 0.001$) with nuclear translocation. In addition, the ability of CSP to promote the expression of macrophage efferocytosis-related genes was significantly affected after knockdown of PPAR- γ ($P < 0.05$). Our study suggests that CSP may enhance oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced macrophage efferocytosis through activating PPAR- γ signaling pathway.

Key words: Cordyceps; polysaccharides; macrophages; efferocytosis

胞葬作用(Efferocytosis)指吞噬细胞将凋亡、受损或衰老的细胞程序性清除的过程,对维持组织平衡和内环境稳态具有重要的作用^[1]。其中的吞噬细胞包括非专职的吞噬细胞如内皮细胞,以及巨噬细胞为代表的专职吞噬细胞^[2]。巨噬细胞作为体内细胞因子的主要来源,在介导胞葬作用中具有重要的意义。胞葬作用受损被证实与动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、肿瘤等炎症相关性疾病的发生发展紧密相关^[3]。因此,通过改善巨噬细胞的胞葬功能成功清除凋亡细胞以减弱炎症因子的表达可能是炎症相关疾病的一个潜在治疗靶点。

冬虫夏草(Cordyceps)为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥合体,主要含有虫草素、虫草蛋白和虫草多糖等多种活性成分^[4]。现代药理学研究发现冬虫夏草具有调节免疫、调节血脂、抗炎、抗氧化、抗疲劳等作用^[5,6]。临床上,含冬虫夏草的复方制剂可用于联合治疗动脉粥样硬化和慢性阻塞性肺病。课题组前期研究发现,多糖作为冬虫夏草主要的生物活性成分,可有效降低血清炎症因子,改善动脉粥样硬化小鼠和慢性阻塞性肺病小鼠的炎症反应,但其对巨噬细胞的胞葬功能是否具有调节作用尚不清楚。因此,本研究将以改善巨噬细胞胞葬功能为目的,探究冬虫夏草多糖(Cordyceps polysaccharides, CSP)对巨噬细胞胞葬作用的影响及其调控机制,旨在为冬虫夏草的进一步开发利用提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞(上海中科院细胞库);Jurkat 人 T 淋巴细胞白血病细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司);野生冬虫夏草采自于四川省康定市雅家梗(101°97' ~ 102°59' E, 30°05' ~ 31°

43' N, 海拔 3 800 ~ 500 m), 经由国锦琳教授鉴定确认为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的完整干燥复合体。

正丁醇、三氯甲烷(均为分析纯,四川西陇科学有限公司);氢氧化钠(NaOH)(批号:20211206)、硝酸钠(NaNO₃)(批号:10019918)均购自国药集团化学试剂有限公司;叠氮化钠(NaN₃)(批号:200001012,沈阳化学试剂产);Tween-20(批号:223Y013,北京索莱宝科技有限公司);普鲁兰多糖(批号:7E1412,日本shodex公司);磷酸盐缓冲溶液(批号:G4202,武汉塞维尔生物科技有限公司);opti-MEM 培养基(批号:31985-707,美国Gibco公司);Cell Counting Kit-8(CCK-8)(批号:006Z0102,US Everbright公司);PPAR- γ 兔多克隆抗体(批号:A19676,ABclonal公司);RNA 提取试剂盒(批号:R701-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司);Fast SYBR Green qPCR Master Mix UDG 试剂盒(批号:A402-01)、ExonScript RT SuperMix with dsDNase 逆转录试剂盒(批号:A502-01)均购自成都市蓉为基因生物科技有限公司;氧化型低密度脂蛋白(批号:2018-10-25,广州奕元生物技术有限公司);RNA 转染试剂 RNAFit(批号:HB-RF-1000,汉恒生物科技有限公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号:021921210630,碧云天生物技术有限公司);甘露糖(mannose, Man)(批号:D0651Z01504)、核糖(ribose, Rib)(批号:B21897)、鼠李糖(rhamnose, Rha)(批号:027GS165538)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA)(批号:R09J11H115178)、半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA)(批号:K07J12B133073)、N-乙酰-氨基葡萄糖(N-acetyl-glucosamine, AGlc)(批号:B34227)、葡萄糖(glucose, Glc)(批号:S22J12H137237)、N-乙酰-氨基半乳糖(N-acetyl-D-galactosamine, AGla)(批号:S61480)、半乳糖(galac-

tose, Gal) (批号: Z22J9H64187)、木糖(xylose, Xyl) (批号: D17N9S74410)、阿拉伯糖(arabinose, Ara) (批号: Z23D11H135480)、岩藻糖(fucose, Fuc) (批号: M15HB178211)均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

高效凝胶渗透色谱仪(LC20 高效液相色谱泵, RID-20A 示差折光检测器, 日本岛津公司); LC-20AD 高效液相色谱(日本岛津公司); 5975C 气相色谱仪(美国 Agilent 公司); SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗科技有限公司); Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); Veriti 梯度 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司); FAC-SCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CSP 的提取及含量测定

称取 10 g 冬虫夏草粉末, 按 1:30 (g/mL) 的料液比, 80 °C 热水提取 3 次, 每次 2 h, 合并浓缩提取液, 加入 5 倍体积的 95% 乙醇, 醇沉过夜, 采用 Sevag 试剂(正丁醇: 三氯甲烷 = 1:5) 脱蛋白后, 60 °C 减压浓缩, 使用 3.5 kDa 透析袋于超纯水中透析 3 次, 每次 8 h, 低温冷冻干燥, 制得虫草多糖样品 CSP 用于后续实验。参考 Qin 等^[7] 采用苯酚-浓硫酸法测定虫草多糖含量。

1.3.2 CSP 分子量测定

采用高效液相凝胶色谱法(high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 确定虫草多糖的分子量分布。对照品为普鲁兰多糖标准品。色谱条件: 色谱柱为 TSKgel GMPWXL 水相凝胶色谱柱; 流动相为 0.1 mol/L NaNO₃/0.06% NaN₃ 水溶液; 流速为 0.6 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

1.3.3 CSP 单糖组成的测定

采用高效液相色谱法(high pressure liquid chromatography, HPLC) 对虫草多糖样品中单糖组成进行测定。对照品为甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、N-乙酰-氨基葡萄糖、葡萄糖、N-乙酰-氨基半乳糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖的标准品混合物。供试品为 0.2 mol/L 三氟乙酸处理多糖样品后的水解产物。色谱条件: 色谱柱为 Xtimate C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH = 6.7): 乙腈 = 83:17; 检测波长 250 nm; 流速为 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

1.3.4 CSP 甲基化分析

将 CSP 样品溶解在 DMSO 中, 然后用 CH₃I 在

DMSO/NaOH 中甲基化, 用 2 mol/L 的三氟乙酸于 121 °C 下水解 1.5 h。然后用 NaBD₄ 还原所得混合物, 并在 100 °C 下用乙酸酐乙酰化 2.5 h。采用 GC-MS 分析甲基化糖醇乙酸酯衍生物, 色谱柱为 Agilent SGE BPX70 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), 载气为氦气(分流比为 10:1), 进样量 1 μL, 初始柱温 140 °C, 保持 2 min, 程序升温, 以 3 °C/min 的速度升至 230 °C, 并在 230 °C 下保持 3 min。扫描模式为 SCAN, 范围(*m/z*) 为 50 ~ 350。根据保留时间和质谱信息鉴别衍生化产物, 根据峰面积计算各残基的摩尔比。

1.3.5 CSP 对 RAW 264.7 细胞活力影响

RAW 264.7 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养。取对数生长期 RAW 264.7 细胞按照 1 × 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板培养至细胞汇合 90%。设置实验组、空白组和对照组, 实验组分别使用 0、100、200、400、800、1 000 μg/mL CSP 处理 24 h, 处理结束后, PBS 洗 3 次, 每孔加入 100 μL 配置好的 10% CCK-8 溶液, 5% CO₂、37 °C 孵育 0.5 h, 于 450 nm 处测定各孔吸光度值, 按式(1) 计算 RAW 264.7 细胞活力(*R*)。

$$R = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中, *A*₁ 为经药物处理后细胞的吸光度值; *A*₂ 为未经药物处理细胞的吸光度值; *A*₀ 为培养基的吸光度值, 即空白组。

1.3.6 细胞分组与干预

取生长状态良好的 RAW 264.7 细胞, 以 1 × 10⁶ 个/孔接种于 6 孔板, 设置对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、CSP 低(CSP in low dose, CSP-L)、中(CSP in middle dose, CSP-M)、高(CSP in high dose, CSP-H) 剂量组。对照组给予完全培养基, 模型组和 CSP 组细胞给予 50 μg/mL ox-LDL 诱导, 同时各剂量 CSP 组细胞分别给予含 200、400、800 μg/mL CSP 的培养基, 置于细胞培养箱继续培养 24 h。

1.3.7 RT-qPCR 检测胞葬相关基因表达

按“1.3.6”中的方法处理完细胞后, 分别收集各组细胞。提取 RAW 264.7 细胞总 RNA 后, 取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA, 以 1 μL cDNA 作为模板, 通过 RT-qPCR 法检测巨噬细胞胞葬作用的关键基因 Axl、Tyro3 和 Mfge8 的表达水平, 程序为: 95 °C 预变性 3 min 后, 以 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次。

引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')
Axl	F:GAGCCAACCGTGGAAAGA R:AGGCCACCTTATGCCGATCTA
Tyro3	F:GCCTCCAAATTGCCCGTCA R:CCAGCACTGGTACATGAGATCA
Mfge8	F:ATATGGGTTTCATGGGCTTG R:GAGGCTGTAAGCCACCTTGA
GAPDH	F:AGTCTGGTGTGAACGGATTTC R:TGTAGACCATGTAGTTGAGGCTCA

1.3.8 流式细胞术检测 CSP 对胞葬功能的影响

Jurkat 人 T 淋巴细胞白血病细胞置于紫外线下分别照射 0、30、60、90、120、150、180、210、240 和 270 min。用细胞凋亡试剂盒(含 Annexin V-FITC 和 PI)进行细胞染色,置于室温避光孵育 15 min,随后置于冰浴中,采用流式细胞仪及相关软件分析 Jurkat 细胞凋亡率。Annexin V-FITC 和 PI 双染的 Jurkat 细胞代表晚期凋亡。

RAW 264.7 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,按照“1.3.6”方法处理细胞。以 Cell-Tracker™ Green CMFDA 探针对 Jurkat 细胞进行染色标记,按 3×10^6 个/皿接种于平皿,紫外线照射 270 min,诱导细胞凋亡,随后放入培养箱中平衡 30 min。吸去 96 孔板的旧培养基,以 5:1 的比例将凋亡的 Jurkat 细胞加入 RAW 264.7 共培养 120 min。共培养结束后用预冷磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗掉未被吞噬的 Jurkat 细胞,以 F4/80 探针对小鼠 RAW 264.7 细胞进行染色标记,收集细胞, PBS 重悬,用流式细胞仪进行分析。

1.3.9 Western blot 和间接免疫荧光法检测 PPAR- γ 蛋白表达

参照“1.3.6”方法干预细胞后,加入细胞裂解液提取总蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量。将蛋白样品上样至聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,电转至 PVDF 膜。封闭 1 h 后,以一抗(兔抗 PPAR- γ) 4 °C 孵育过夜,二抗(HRP-山羊抗兔)室温孵育 1 h。电化学法显影后,采集条带,并采用 Image J 软件进行灰度值分析,计算目的蛋白表达水平。

RAW 264.7 以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,按“1.3.6”方法干预完成后弃去培养液,4% 多聚甲醛固定 15 min,破膜液处理 20 min,免疫染色封闭液封

闭 1 h,随后将细胞与兔抗 PPAR- γ 抗体 4 °C 孵育过夜。使用 Rhodamine (TRITC) 552-偶联二抗作用细胞 1 h,磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST, 100 mL PBS + 100 μ L Tween-20)清洗后避光加入 DAPI 封片剂对细胞核进行染色并封片,荧光显微镜观察结果。

1.3.10 si-RNA 转染及筛选

RAW 264.7 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板,当细胞密度达 30% 进行转染。分别设置正常对照组(Con)、正常对照小干扰 RNA 组(si-Con)、PPAR- γ -1 小干扰 RNA 组(si-1)、PPAR- γ -2 小干扰 RNA 组(si-2)、PPAR- γ -3 小干扰 RNA 组(si-3)(见表 2)。以无血清 opti-MEM 培养基稀释 si-RNA 使其终浓度为 25 nmol/L,混匀后加 20 μ L RNAfit,得到转染复合物。除 Con 组其余各组均加入相应转染复合物,再加入无血清 opti-MEM 培养基补足至 1 mL;Con 组直接加入 1 mL 无血清 opti-MEM 培养基。5% CO₂、37 °C 孵育 4 h,随后加入 1 mL 含 20% 胎牛血清的 opti-MEM 培养基,培养 72 h 后提取蛋白,参考“1.3.9”的方法采用 Western blot 评价小干扰 RNA 的敲减效率。

表 2 小干扰 RNA 的序列表

Table 2 The sequence of siRNA

组别 Group	序列 Sequence (5'→3')
si-Con	正义:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反义:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
si-1	正义:CAAUGGUUGCUGAUUACAATT 反义:UUGUAAUCAGCAACCAUUGTT
si-2	正义:GGCGCAUCUUGACAGGAAATT 反义:UUUCCUGUCAAGAUCGCCCTT
si-3	正义:AGUUUGCUGUGAAGUUCAATT 反义:UUGAACUUCACAGCAAACUTT

1.3.11 RT-qPCR 检测 PPAR- γ 对 RAW 264.7 胞葬能力的影响

将细胞分为 Con 组、Mod 组、CSP 组和 CSP + si-3 组,按“1.3.10”的方法进行转染,48 h 后,CSP 组和 CSP + si-3 组加入 800 μ g/mL CSP 作用 24 h;结束后收集各组细胞,参照“1.3.7”的方法提取总 RNA 并检测 PPAR- γ 及胞葬相关基因表达量,以 GAPDH 基因为内参,用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.3.12 数据处理与统计

每组试验至少重复 3 次,数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计分析使用 SPSS 22 软件,

图片绘制使用 Prism Graph Pad 9.5 软件。两组间比较采用非配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CSP 总糖含量测定与结构表征

如图 1A 所示,采用苯酚-硫酸法,以葡萄糖为标准品绘制标准曲线,得到 CSP 中的总糖含量为 72.9%。利用高效液相凝胶色谱法从 CSP 样品分离出三个组分,其出峰时间分别是 9.811、13.131、

15.298 min,重均分子量分别为 21.9、2 100 及大于 50 000 kDa(见图 1B)。高效液相色谱法测得 CSP 主要由葡萄糖、半乳糖和甘露糖三种单糖组成(见图 1C、1D)。甲基化结果显示,CSP 糖残基主要有末端葡萄糖(t-Glc)、3-连接吡喃葡萄糖(3-Glc)、2-连接吡喃甘露糖(2-Manp)、6-连接吡喃甘露糖(6-Manp)、2-连接吡喃半乳糖(4-Galp)、3,4-连接吡喃葡萄糖(3,4-Glc),其摩尔百分比为 18.30:6.92:10.52:5.67:26.40:9.80(见表 3)。

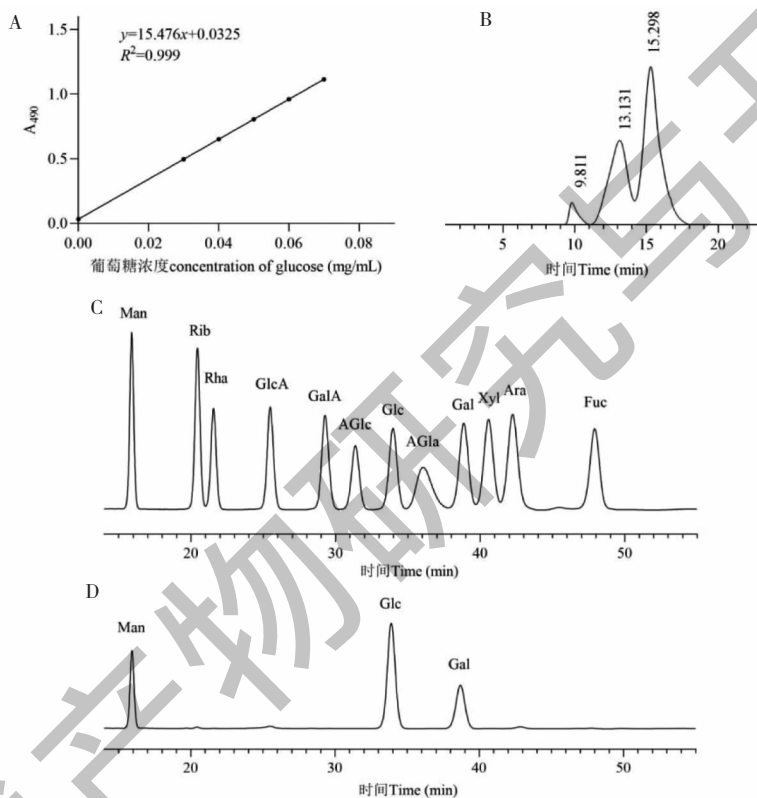


图 1 CSP 多糖含量、分子量及单糖组成

Fig. 1 The polysaccharide content, molecular weight and monosaccharide composition of CSP

注:A:葡萄糖标准曲线;B:CSP 的 HPGPC 图谱;C:标准品的 HPLC 图谱;D:CSP 的 HPLC 图谱。Note:A:Glucose standard curve;B:HPGPC diagram of CSP;C:HPLC chromatogram of the standard sample;D:HPLC chromatogram of CSP.

表 3 CSP 的甲基化结果

Table 3 The methylation results of CSP

糖苷键类型 Type of glycosidic bond	甲基化单糖 Methylated monosaccharides	分子量 Molecular weight	摩尔比 Molar ratio (%)
t-Glc	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl glucitol	323	18.30
3-Glc	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl glucitol	351	6.92
2-Manp	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl mannitol	351	10.52
6-Manp	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl mannitol	351	5.67
4-Galp	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl galactitol	351	26.40
3,4-Glc	1,3,4,5-Tetra-O-acetyl-2,6-di-O-methyl glucitol	379	9.80

2.2 CSP 对巨噬细胞胞葬相关基因表达的影响

如图 2A 所示,经不同浓度 CSP 处理后,细胞存活率相较于对照组均无明显差异($P > 0.05$),说明 100 ~ 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSP 对细胞活力无显著影响。因此,本研究选择 200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别作为低中高浓度用于后续实验。胞葬作用的有效完成需要多种分子协同配合,如“find me”信号分子、“eat me”信号分子、桥接分子等。Tyro3、Axl 作为 TAM 家族酪氨酸激酶受体家族“eat me”受体,有助于清除各种

细胞类型中的细胞碎片,促进凋亡细胞的吞噬作用,以维持组织稳态^[8]。Mfge8 作为桥接分子,能够使凋亡细胞“eat me”信号分子与巨噬细胞的吞噬受体结合,从而完成吞噬^[9]。研究表明,缺失或下调 Axl、Tyro3、Mfge8 可以引起巨噬细胞胞葬功能的缺失。本实验经不同浓度 CSP 处理后的细胞中 Axl、Tyro3 和 Mfge8 的 mRNA 表达量相较于模型组明显升高($P < 0.01$) (见图 2B、2C),提示冬虫夏草多糖提高了巨噬细胞的胞葬能力。

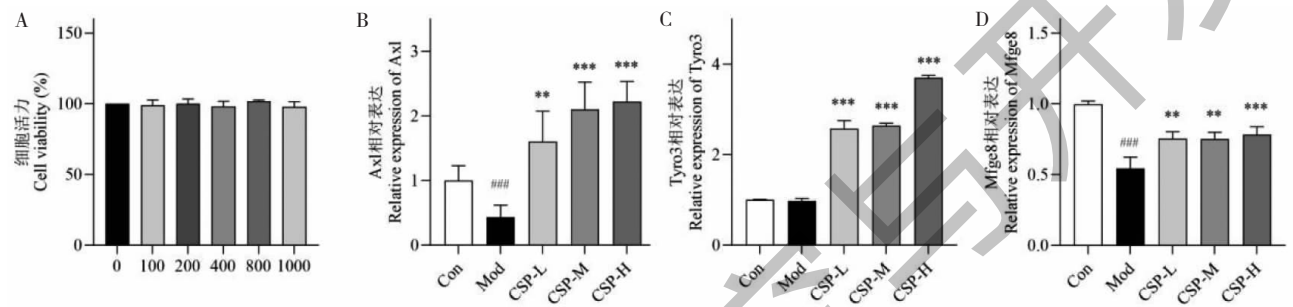


图 2 不同浓度 CSP 对巨噬细胞细胞活力的影响及胞葬相关基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of CSP on the viability of macrophages and the expression of efferocytosis-related genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,下同。Note: Compared with Con, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with Mod, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same blow.

2.3 CSP 对巨噬细胞胞葬功能的影响

为评价 CSP 对巨噬细胞胞葬功能的影响,本研

究首先采用紫外线照射 Jurkat 细胞,建立凋亡细胞模型。如图 3A、3B 所示,经照射 90、120、150、180、

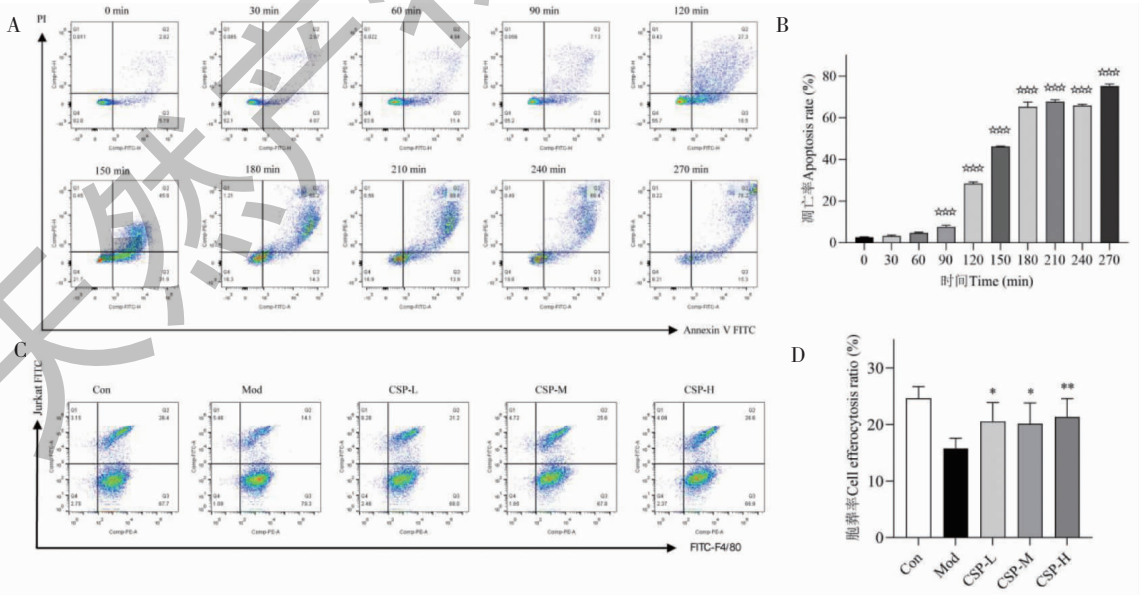


图 3 CSP 对巨噬细胞胞葬功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of CSP on the efferocytosis function of macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 0 min 比较, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with 0 min, *** $P < 0.001$.

210、240、270 min 后 Jurkat 细胞晚期凋亡率较对照组均明显升高($P < 0.001$)。其中紫外照射 270 min 后, Jurkat 细胞的凋亡率高达(75.3 ± 0.91)%。因此, 选择紫外线照射 270 min 为最佳造模条件。流式细胞术结果显示, ox-LDL 作用后的巨噬细胞胞葬能力减少($P < 0.001$), 而低中高剂量的 CSP 干预后, 巨噬细胞的胞葬能力明显得到改善($P < 0.05$) (见图 3C、3D)。

2.4 CSP 对巨噬细胞 PPAR- γ 表达及核定位的影响

PPAR- γ 已被证实参与调控巨噬细胞的胞葬功能, 为探究 CSP 改善巨噬细胞胞葬功能的机制, 本研究采用 Western blot 和免疫荧光分别评价 CSP 对巨噬细胞 PPAR- γ 表达及核定位的影响。如图 4 所示, 与模型组相比, CSP 组细胞中 PPAR- γ 蛋白表达水平升高, 并且随 CSP 浓度的升高, PPAR- γ 蛋白表达水平呈剂量依赖型升高($P < 0.05$)。如图 5 所

示, 免疫荧光结果表明, 与模型组比较, CSP-H 不仅提高了巨噬细胞 PPAR- γ 的表达量($P < 0.001$), 而且促进了 PPAR- γ 的核转运。

2.5 PPAR- γ 对 CSP 促进巨噬细胞胞葬作用的影响

为了验证 PPAR- γ 是否在 CSP 促进巨噬细胞胞葬功能中起调控作用, 利用小干扰 RNA 敲低 PPAR- γ 的表达, 通过 Western blot 筛选出最佳 si-RNA。如图 6A、6B 所示, 相较于 si-Con, si-3 组 PPAR- γ 蛋白表达明显降低($P < 0.05$), 而 si-1 与 si-2 组无明显变化($P > 0.05$)。因此, 选择 si-3 进行细胞转染实验。RT-qPCR 结果显示, 与模型组相比, 经 CSP 处理后, 巨噬细胞中 Axl、Tyro3 和 Mfge8 的表达明显上升($P < 0.05$), 而敲低了 PPAR- γ 的分组, CSP 处理不能增强 Axl、Tyro3 和 Mfge8 的表达, 胞葬作用明显降低($P < 0.001$) (见图 6C ~ 6E), 说明 PPAR- γ 可能是促进巨噬细胞胞葬功能的潜在靶点。

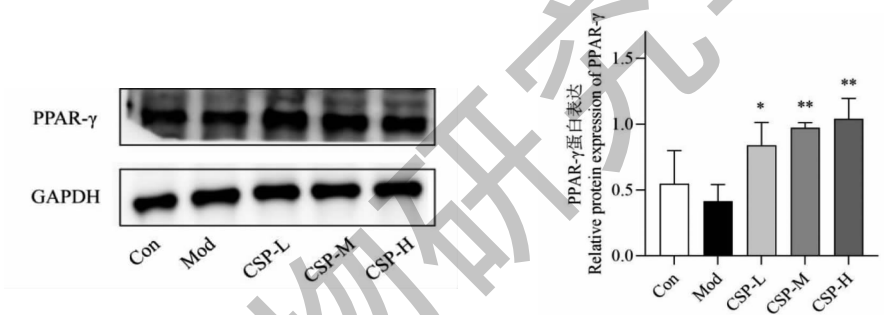
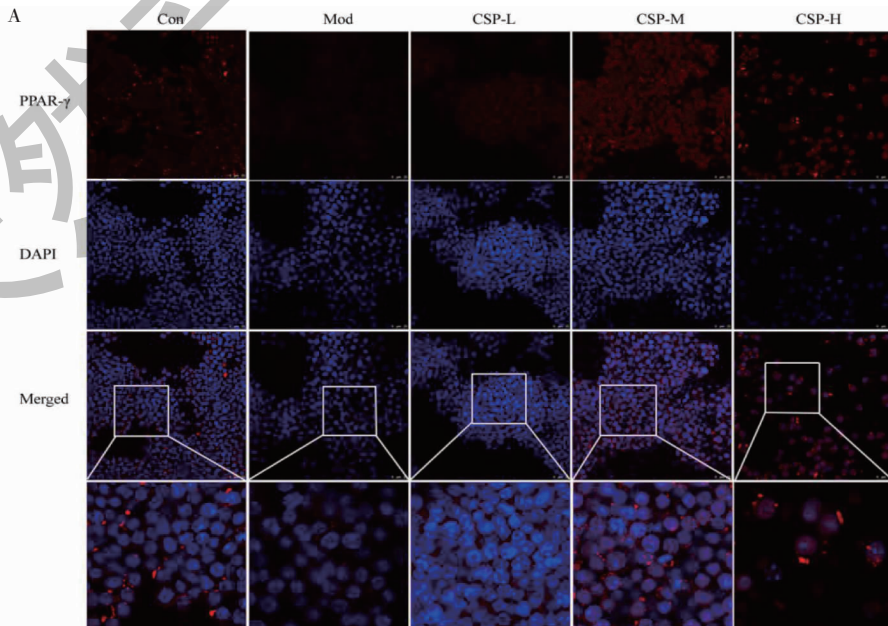


图 4 CSP 对 PPAR- γ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of CSP on PPAR- γ protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



续图 5 (Continued Fig.5)

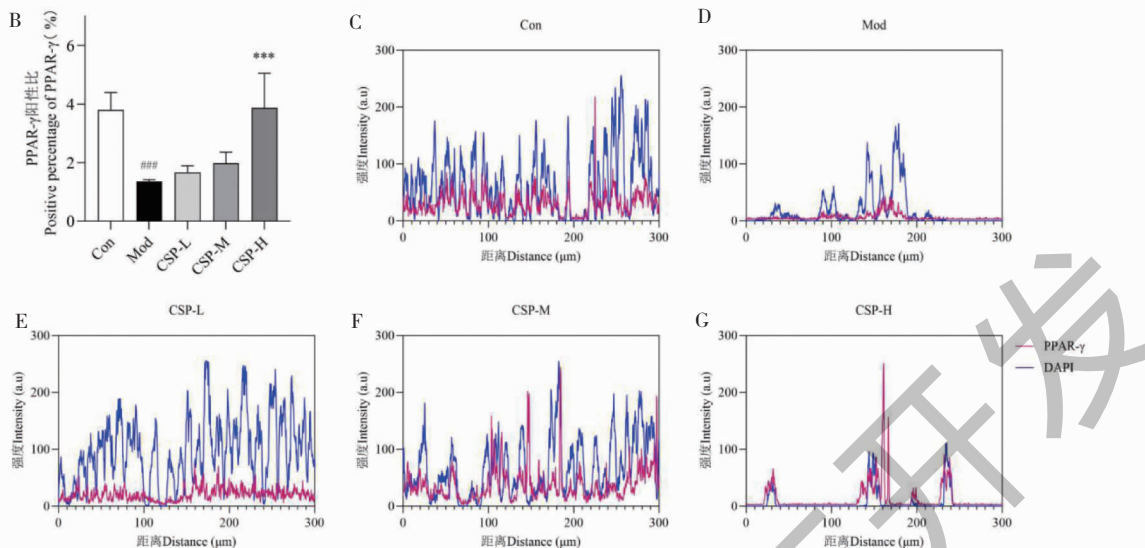


图5 CSP对巨噬细胞中PPAR- γ 表达和核定位的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.5 Effect of CSP on the expression and nuclear localization of PPAR- γ in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

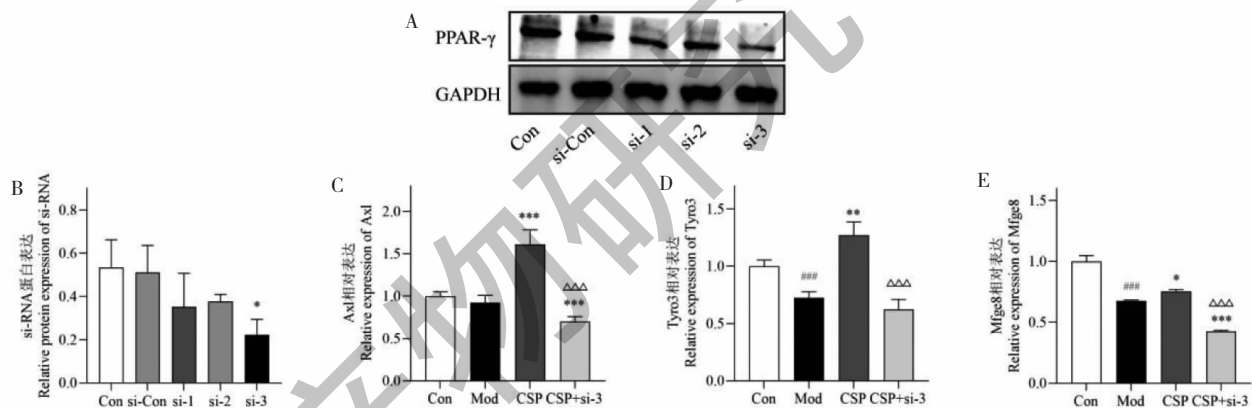


图6 PPAR- γ 对CSP促进巨噬细胞胞葬作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.6 Effect of PPAR- γ on the promotion of macrophage efferocytosis of CSP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与CSP相比, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。Note: Compared with CSP, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

3 讨论与结论

多糖是由超过10个的单糖组成的结构复杂的高分子碳水化合物,文献报道多糖具有免疫调节、抗氧化、抗炎和降血糖等功效^[10]。冬虫夏草多糖作为冬虫夏草含量最高的药理活性物质,药用价值显著。本研究对CSP的结构进行了表征,并发现其可提高巨噬细胞的胞葬能力,有效改善胞葬功能障碍,并初步确定了PPAR- γ 在冬虫夏草多糖改善胞葬作用中发挥的重要作用。

本研究通过水提醇沉法获得冬虫夏草多糖CSP,通过PMP柱衍生高效液相色谱法测得CSP主要由葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成,这与Deng

等^[11]的报道一致。高效液相色谱法测得CSP的重均分子量为21.9、2100及大于50000 kDa(现有柱子的最大检出限),明显高于Gong^[12]测得的虫草多糖分子量43 kDa,及Zhang等^[13]报道的22.37 kDa,与Wang^[14]测得虫草多糖分子量(1、15、950 kDa)相比,本研究获得的冬虫夏草多糖的分子量也较高,但与Zhou^[15]测得的不同规格冬虫夏草多糖组分1的分子量 5×10^4 kDa相差不大。这可能与虫草的来源、规格、生长环境、多糖提取方式、检测方法以及虫草多糖的黏度等因素有关。目前,由于天然冬虫夏草资源紧缺,而冬虫夏草菌丝体因与天然冬虫夏草具有相似的化学组成^[16]而受到关注,许多

研究者正尝试利用菌丝体代替冬虫夏草。然而,大量研究已证实冬虫夏草与其菌丝体在多糖组成和结构上差异明显。与冬虫夏草多糖相比,菌丝体多糖组成更加复杂,除葡萄糖、半乳糖和甘露糖外,还含有阿拉伯糖、木糖和鼠李糖等。此外,菌丝体多糖与冬虫夏草多糖的分子量差异也很大^[14]。另有相关研究表明,分子量较大的多糖具有更好的药理作用^[17],提示冬虫夏草多糖与菌丝体多糖的生物学活性可能存在较大差异,这值得后期继续研究。

巨噬细胞胞葬作用能够及时识别、吞噬、消化凋亡细胞防止其进一步坏死和释放炎症介质^[18],以保护周围组织免受损害,并促进炎症消退和功能恢复,维持机体稳态。巨噬细胞作为主要效应细胞,促进巨噬细胞的胞葬作用可能成为减少炎症反应发生的新方法。课题组前期研究结果发现 CSP 可有效减轻巨噬细胞炎症反应,因此,深入研究 CSP 的胞葬作用及其机制具有重要的理论价值和现实意义。本研究评估了 CSP 对小鼠巨噬细胞的胞葬作用,初步探索了其发挥胞葬作用的机制。结果表明 CSP 通过上调胞葬相关基因 *Axl*、*Tyros3* 和 *Mfge8* 的 mRNA 表达,增强了巨噬细胞的胞葬功能。

PPAR- γ 是参与炎症反应的主要通路^[19],高表达于巨噬细胞,对其极化分型具有重要意义^[20]。近年研究发现 PPAR- γ 可以调节吞噬受体和桥接分子的表达^[21,22],驱动细胞凋亡-吞噬基因的表达,对巨噬细胞的胞葬作用至关重要。为了进一步探究 PPAR- γ 是否影响了 CSP 对巨噬细胞胞葬作用,本研究采用 Western blot 和免疫荧光分析 PPAR- γ 在巨噬细胞中的蛋白表达与核转位。结果表明 CSP 促进了巨噬细胞 PPAR- γ 的蛋白表达及入核。此外,当敲低了巨噬细胞 PPAR- γ ,胞葬相关基因的表达量明显下降,逆转了 CSP 对巨噬细胞胞葬功能的促进作用。这些结果提示,CSP 干预能有效促进巨噬细胞胞葬,可能是通过激活 PPAR- γ 信号通路实现的。但由于本研究仅在体外实验验证 CSP 对巨噬细胞胞葬功能促进作用,而在体内 CSP 经胃肠道消化吸收后是否仍然能够发挥类似作用需进一步研究探讨。

综上所述,本研究发现 CSP 可以通过巨噬细胞胞葬作用影响炎症相关疾病的发生发展,并且 PPAR- γ 的激活介导了 CSP 在改善小鼠巨噬细胞胞葬功能中的作用,为明确虫草多糖发挥药理作用的分子机制提供参考,对冬虫夏草的开发利用具有积

极意义。

参考文献

- 1 Boada-Romero E, Martinez J, Heckmann BL, et al. The clearance of dead cells by efferocytosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 398-414.
- 2 Gerlach BD, Ampomah PB, Yurdagul AJ, et al. Efferocytosis induces macrophage proliferation to help resolve tissue injury[J]. *Cell Metab*, 2021, 33: 2445-2463.
- 3 Geng L, Zhao J, Deng Y, et al. Human SLE variant NCF1-R90H promotes kidney damage and murine lupus through enhanced Tfh2 responses induced by defective efferocytosis of macrophages[J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81: 255-267.
- 4 Krishna KV, Ulhas RS, Malaviya A. Bioactive compounds from Cordyceps and their therapeutic potential[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2024, 44: 753-773.
- 5 Wei S, Peng W, Zhang C, et al. *Cordyceps sinensis* aqueous extract regulates the adaptive immunity of mice subjected to ⁶⁰Co γ irradiation[J]. *Phytother Res*, 2021, 35: 5163-5177.
- 6 Deng JS, Jiang W P, Chen CC, et al. *Cordyceps cicadae* mycelia ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing the TLR4/NF- κ B/MAPK and activating the HO-1/Nrf2 and Sirt-1/AMPK pathways in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7912763.
- 7 Qin HJ, Wu XY, Xiao Q. Spectrometric determination and antioxidant activity analysis of polysaccharides in the leaves of *Cornus elliptica*[J]. *J Hubei Minzu Univ; Nat Sci(湖北民族大学学报:自科版)*, 2022, 40: 361-366.
- 8 Aehnlich P, Powell RM, Peeters M, et al. TAM receptor inhibition-implications for cancer and the immune system[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 1195.
- 9 Zhang YF, Liu P. Guanxinkang enhances the efferocytosis of mouse bone marrow-derived macrophages through SENP1/STAT3[J]. *Global Tradit Chin Med(环球中医药)*, 2022, 15: 1755-1760.
- 10 Wang C, Ye J, He XG, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of Polygonati Rhizoma and prediction analysis of quality marker[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2024, 36: 881-899.
- 11 Deng Y, Zhang JL, Wang LY, et al. Analysis of monosaccharide composition in polysaccharides of *Cordyceps* spp. by TLC[J]. *J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2018, 38: 13-21.
- 12 Gong M, Zhu Q, Wang T, et al. Molecular structure and immune activity of polysaccharides from *Cordyceps sinensis*[J]. *Chin Biochem J(生物化学杂志)*, 1990, 6: 486-492.
- 13 Zhang XL, Liu BC, Al-Assaf S, et al. *Cordyceps sinensis* de-

- creases TGF- β 1 dependent epithelial to mesenchymal trans-differentiation and attenuates renal fibrosis[J]. Food Hydrocolloids,2012,28:200-212.
- 14 Wang JQ. Characterization of chemical composition and polysaccharide structure from natural *Cordyceps sinensis* and cultured mycelium[D]. Nanchang: Nanchang University (南昌大学),2017.
- 15 Zhou JQ, Li WQ, Huang YJ, et al. Comparative analysis of polysaccharide composition of *Cordyceps sinensis* of different specifications[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2023,34:1615-1618.
- 16 Zhang JS, YU H, Zhong Y, et al. Fingerprint characteristics of polysaccharides from *Cordyceps sinensis* and its fermentation mycelium[J]. N Horticulture(北方园艺),2018,24:140-145.
- 17 Wu TR, Lin CS, Chang CJ, et al. Gut commensal Parabacteroides goldsteinii plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis* [J]. Gut,2019,68:248-262.
- 18 Doran AC, Yurdagül AJ, Tabas I. Efferocytosis in health and disease[J]. Nat Rev Immunol,2020,20:254-267.
- 19 Stark JM, Coquet JM, Tibbitt CA. The role of PPAR- γ in allergic disease[J]. Curr Allergy Asthma Rep,2021,21:45.
- 20 Wang X, Ji Y, Feng P, et al. The m6A reader IGF2BP2 regulates macrophage phenotypic activation and inflammatory diseases by stabilizing TSC1 and PPAR γ [J]. Adv Sci (Wein),2021,8:2100209.
- 21 Harder JW, Ma J, Alard P, et al. Male microbiota-associated metabolite restores macrophage efferocytosis in female lupus-prone mice via activation of PPAR γ /LXR signaling pathways [J]. J Leukoc Biol,2023,113:41-57.
- 22 Huang Q, Weng D, Yao S, et al. Progranulin deficiency suppresses allergic asthma and enhances efferocytosis via PPAR- γ /MFG-E8 regulation in macrophages [J]. Immun Inflamm Dis,2023,11:e779.
- (上接第 1319 页)
- 20 Guo YW, Huang WH, Song GQ, et al. Chemical shift assignment of two chromone glycosides extracted from Chinese herb *Adina pilulifera* [J]. Chin J Magn Reson(波谱学杂志),2003,20:265-269.
- 21 Lin MH, Liu HK, Huang WJ, et al. Evaluation of the potential hypoglycemic and β -cell protective constituents isolated from Corni Fructus to tackle insulin-dependent diabetes mellitus [J]. J Agric Food Chem,2011,59:7743-7751.
- 22 Atsuko I, Tanaka Y, Nagakura N, et al. Phenolic and iridoid glycosides from *Strychnos axillaris* [J]. Phytochemistry,2008,69:1208-1214.
- 23 Peng JL, Wang P, Peng QX, et al. Chemical constituents and anti-inflammatory activity of *Gentiana davidii* Franch [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)2023,35:1716-1723.
- 24 Tian MQ, Dai HF, Li XM, et al. Chemical constituents of marine medicinal mangrove plant *Sonneratia caseolaris* [J]. Chin J Oceanol Limn,2009,27:288-296.
- 25 Yang H, Zhou QY, Chen Y, et al. Chemical constituents from the leaves of *Synadenium grantii* and their anti-inflammatory activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1698-1703.
- 26 Song GX, Ma LY, Wei F, et al. Chemical constituents of *Syringae Cortex* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志),2012,47:1979-1982.
- 27 Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia* [J]. Phytochemistry,2002,59:551-556.
- 28 Wu T, Li Y, Kong DY, et al. Chemical Constituents of *Helician nilagirica* Beed [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志),2010,45:1224-1227.